

Cd Pb 单一及复合污染沉积物对铜锈环棱螺 肝胰脏 SOD 和 MT 的影响

马陶武, 朱 程, 周 科, 刘 佳, 彭巾英, 彭清静

(吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000)

摘 要:以实验室培养的铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)为测试生物,采用 28 d 沉积物生物毒性测试研究了 Cd、Pb 单一及复合污染沉积物对铜锈环棱螺肝胰脏超氧化物歧化酶(SOD)活性和金属硫蛋白(MT)含量的影响,并分析了 Cd 和 Pb 对 SOD 和 MT 的联合作用特征。结果表明,Cd、Pb 单一污染沉积物均对肝胰脏 SOD 活性具有显著的促进作用,且 SOD 活性随胁迫浓度的增加而升高,中、高浓度 Pb 胁迫下的 SOD 活性显著高于相应浓度的 Cd 胁迫。低浓度 Cd、Pb 单一胁迫对 MT 没有影响,中、高浓度 Cd 胁迫引起 MT 水平显著升高,而中、高浓度 Pb 胁迫导致 MT 水平显著下降。低、中和高浓度 Cd-Pb 复合胁迫均对肝胰脏 SOD 活性具有显著的促进作用,且 SOD 活性随胁迫浓度的增加而升高,但低于 Cd、Pb 单一胁迫下的 SOD 活性。低浓度 Cd-Pb 联合胁迫对 MT 没有影响,中、高浓度 Cd-Pb 联合胁迫导致 MT 含量显著升高。SOD 对 Cd-Pb 联合胁迫的敏感性高于 MT。析因分析表明,Cd-Pb 对 SOD 的联合作用表现为拮抗作用;中、高浓度 Cd-Pb 对 MT 的联合作用表现为相加作用,其交互作用机理有待进一步研究。

关键词:镉;铅;铜锈环棱螺;肝胰脏;超氧化物歧化酶;金属硫蛋白;联合作用;析因分析

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)01-0030-08

Effects of Cd, Pb and Combined Contaminated Sediments on Hepatopancreatic SOD and MT in *Bellamya aeruginosa*

MA Tao-wu, ZHU Cheng, ZHOU Ke, LIU Jia, PENG Jin-ying, PENG Qing-jing

(College of Biology and Environmental Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: The effects of exposure to individual and joint Cd and Pb contaminated sediments on the hepatopancreatic superoxide dismutase (SOD) activities and metallothionein (MT) contents in *Bellamya aeruginosa* from lab cultures were investigated through a 28 d bioassay, and the characteristics of combined effects of Cd and Pb on hepatopancreatic SOD and MT were analyzed. The results showed that hepatopancreatic SOD activities were significantly induced by individual Cd or Pb contaminated sediments, and went up with the increase of Cd or Pb concentration, SOD activities under Pb stress with medium and high concentrations were clearly higher than that under Cd stress. Cd or Pb stress with relatively low concentration had no effect on hepatopancreatic MT contents, Cd stress with medium or high concentration significantly elevated MT contents, however, Pb stress with medium or high concentration significantly decreased MT contents. The hepatopancreatic SOD activities were also significantly induced by combined stress of Cd-Pb with low, medium, and high concentration, and went up with the increase of Cd-Pb concentrations, but lower than that under corresponding individual Cd or Pb stress. The combined stress of Cd-Pb with low concentration had no effect on MT contents, the combined stress of Cd-Pb with medium and high concentration caused significant elevation of MT. Hepatopancreatic SOD was more sensitive to the combined stress of Cd-Pb than MT. Factorial analysis indicated that the combined effect of Cd and Pb to SOD was characterized as antagonistic effect, and the combined effect of Cd and Pb with medium and high concentration to MT was characterized as additive effect, the mechanisms of Cd-Pb interaction were deserved to be further studied.

Keywords: cadmium; lead; *Bellamya aeruginosa*; hepatopancreas; superoxide dismutase (SOD); metallothionein (MT); combined effect; factorial analysis

收稿日期:2009-08-14

基金项目:国家自然科学基金项目(20677021)

作者简介:马陶武(1968—),男,湖南张家界人,博士,副教授,研究方向为水生态毒理学。E-mail:mtw922@163.com

沉积物是水生生态系统的重要组成部分,可以为水生生物提供栖息场所和营养来源,但它又是各种污染物的蓄积库。不同来源的污染物经过各种物理、化学、生物的转运或转化过程,最终都沉积于沉积物中,重金属由于其持久性和高毒性而对水生生态系统构成严重的环境危害,因此,沉积物中重金属污染及其对水生生物的生态毒性风险已成为近年来重点关注的问题^[1-2]。沉积物重金属污染的主要特征是复合污染,研究沉积物中重金属复合污染对底栖生物的毒作用机制对于污染沉积物危害鉴定和潜在生态风险评估具有十分重要的现实意义。镉(Cd)和铅(Pb)是环境中普遍存在的重金属污染物,毒性强、危害大。目前有关 Cd-Pb 复合污染对一些动物的影响已有一些报道,但这些研究大多是针对实验动物大鼠的^[3-7]。关于 Cd-Pb 复合污染对水生生物影响的研究仅有少量报道^[8-9],而与底栖动物相关的研究则未见报道。重金属的联合毒作用与生物种类有关,Cd-Pb 联合毒作用的机制目前还不太清楚。铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)是属于腹足纲田螺科的淡水软体动物,在我国淡水水体中分布广,主要栖居在沉积物中,以摄食沉积物中有机碎屑、细菌和藻类为生^[10]。该物种是一些鱼类的食物,同时也被人们食用,在食物链中具有重要作用。因此,基于该物种的生物评价将有可能真实地反映沉积物的生态毒性。本研究以实验室培养的铜锈环棱螺为测试生物,采用沉积物毒性测试研究 Cd、Pb 单一及复合污染沉积物对其肝胰脏超氧化物歧化酶(SOD)活性和金属硫蛋白(MT)含量的影响,探讨 Cd-Pb 复合污染对两种分子生物标志物联合作用的特征,以期为进一步开展基于铜锈环棱螺的沉积物生态毒理学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用的铜锈环棱螺来源于实验室人工控制条件下培养的、年龄相同、大小均匀的健康个体,年龄为 4 月龄,壳长为 (18.01 ± 1.08) mm;体重 (1.23 ± 0.18) g。铜锈环棱螺的实验室培养方法如下:种螺采自武汉植物园的人工池塘,以经过处理的无污染自然沉积物作为培养基质(其理化特性见 1.3),培养所用饵料为三元牌观赏鱼饵料,按照实验室建立的培养程序在光、温、氧可控的循环水培养系统中进行人工培养,培养条件为:每个培养缸的体积为 36 L(长×宽×高:45 cm×30 cm×27 cm);培养缸中培养基质和上覆

水的体积比为 1:4;水温 $(24 \pm 1)^{\circ}\text{C}$;光照周期 12 h 白昼:12 h 黑暗;上覆水溶氧在 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上,在上述条件下可以进行多代连续培养。

1.2 仪器与试剂

UV-757CRT 紫外可见分光光度计(上海精科);TGL-16M 台式高速冷冻离心机(长沙平凡);TAS-990 原子吸收分光光度计(北京普析通用);电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES,iCAP6300 Radial,ThermoFisher Scientific,USA);玻璃匀浆器;醋酸镉、硝酸铅、蔗糖、Tris、EDTA-2Na 以及其他试剂均为国产分析纯;牛血红蛋白为上海国药集团化学试剂有限公司产品;超氧化物歧化酶(SOD)和蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验沉积物的收集与处理

实验所用沉积物为采自湖南吉首市德夯自然保护区的自然沉积物。用塑料铲采集表层沉积物样品(0~10 cm 厚度),然后用孔径 0.2 mm 的尼龙筛现场挤压过筛,去除杂物和粗颗粒,静置,倒掉上覆水,并将所采集的多个沉积物样品充分混合均匀,装入聚乙烯塑料袋中,运回实验室。分析表明,该沉积物由淤泥和粘土组成,分别占 33.64%和 66.36%,总有机碳 TOC 4.48%,pH 7.78,总氮(TN) $1.064 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,总磷(TP) $1.215 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,重金属 Cr、Ni、Cu、Zn、Cd 和 Pb 的背景值分别为 60.04、31.34、17.82、109.03、0.39 和 $24.81 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,均低于淡水沉积物质量指南中的生物毒性阈值效应浓度^[11]。

1.4 沉积物毒性测试

本实验共设 10 个处理组,包括对照组;Cd 单一污染的低、中和高浓度组;Pb 单一污染的低、中和高浓度组;Cd-Pb 复合污染的低、中和高浓度联合组,组成 3 个 2×2 析因设计实验,每个处理设置 3 个重复,详见表 1。按照 Pasteris 等的方法进行污染沉积物制备^[12]:先用去离子水分别配制 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 储备液(采用醋酸镉,以纯 Cd 计)和 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pb 储备液(采用硝酸铅,以纯 Pb 计),加标前,先测定沉积物的干湿比,计算每个处理所需湿沉积物和相应 Cd、Pb 储备液的量,然后按 1:1 的体积比进行混合(Cd、Pb 储备液的体积不足部分以去离子水补足),用干净的小木铲搅拌至少 1 h。加标玻璃缸在室温下储存 30 d,在储存期间,每隔 3 d 对加标沉积物充分搅拌 1 次以使 Cd、Pb 在沉积物中均匀分布^[13]。对照沉积物除不加 Cd、Pb 外,按相同方式处理。

实验开始前,按沉积物与上覆水体积比 1:4 的比

表 1 沉积物中 Cd/Pb 实验浓度设计
Table 1 Experimental concentration set-up of Cd/Pb in the sediments

处理	编码	目标浓度 /μg·g ⁻¹ 干重		实测浓度 /μg·g ⁻¹ 干重	
		Cd	Pb	Cd	Pb
无污染的对照	CK	0	0	0.39±0.08	24.81±0.88
低 Cd 污染	Cd(L)	5	0	5.49±0.12	25.51±0.75
中 Cd 污染	Cd(M)	25	0	24.06±0.85	25.45±0.49
高 Cd 污染	Cd(H)	100	0	98.40±1.78	25.17±0.69
低 Pb 污染	Pb(L)	0	20	0.38±0.09	45.38±1.34
中 Pb 污染	Pb(M)	0	125	0.41±0.08	131.57±2.14
高 Pb 污染	Pb(H)	0	500	0.36±0.07	453.37±5.11
低 Cd-Pb 复合污染	Mix(L)	5	20	5.40±0.11	47.84±1.65
中 Cd-Pb 复合污染	Mix(M)	25	125	24.40±0.98	129.04±2.28
高 Cd-Pb 复合污染	Mix(H)	100	500	96.59±1.38	453.04±5.83

例,将每个处理的测试沉积物分别加到 3 个重复测试缸(4 L)中,然后加上覆水(去氯自来水)至满,加水过程尽可能减少对沉积物的扰动。所有测试缸置于一个水浴控温的有机玻璃容器中,静置 24 h。实验开始时,将所选实验螺随机分组,每组 12 只,放入测试缸中,采用上覆水连续更新的方式进行毒性测试^[14-15]。上覆水的更新通过多通道蠕动泵(重庆杰恒)来实现,更新速率为 10 mL·min⁻¹ 以维持测试缸中足够的溶氧(4 mg·L⁻¹)。对每个测试缸加盖尼龙网,中间留一个直径为 5 cm 的孔,供喂食之用。其他条件与螺的培养条件相同。每日投喂 1 次,每隔 3 d 检查 1 次水质,暴露实验持续 28 d。在实验开始和结束时,收集每个处理的沉积物样品,保存备测。实验结束后,取出测试缸中存活的实验螺,用钳子夹破螺壳,从内脏团中分离出肝胰脏,称重,立即放入液氮中保存备测。

1.5 测定方法

1.5.1 沉积物中 Cd、Pb 的测定

采用 HCl-HNO₃-HClO₄-HF-微波消解法对沉积物样品进行消解,通过 ICP-OES 测定 Cd 和 Pb 的含量,同时采用相同程序,分析水系沉积物成分分析标准物质(GBW 07307,国家地质实验测试中心),以进行分析方法质量控制,结果显示,测定值与标准值的相对标准偏差均小于 10%,符合测定要求。由于实验前后每个处理的沉积物中 Cd 和 Pb 的实测浓度没有显著变化,所以沉积物中 Cd、Pb 的实测浓度以实验前后沉积物 Cd、Pb 实测浓度的平均值表示(表 1)。

1.5.2 肝胰脏中 SOD 和 MT 的测定

取肝胰脏样品,按 1:4(g:mL)的比例加入含 0.000 1 mol·L⁻¹ EDTA-2Na、0.01 mol·L⁻¹ 蔗糖和 0.8% NaCl 的

0.01 mol·L⁻¹ pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液,用玻璃匀浆器在冰浴中制成匀浆,于 4 ℃、10 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min,取上清液,即得 20%匀浆,然后稀释成 1%,置液氮中保存备测。采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量;采用羟胺法测定 SOD 活性,具体测定操作和计算按南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书进行。

取肝胰脏样品,按 1:4(g:mL)比例加入含 0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖的 4 mL 0.1 mol·L⁻¹ pH 8.6 的 Tris-HCl 缓冲液,用玻璃匀浆器在冰浴中制成匀浆。于 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 下离心 1.5 h,取上清液,-20 ℃保存备测。采用血红蛋白/钴饱和法测定 MT 含量,参照加春生等的方法^[16],并加以修改:先取部分样品测定蛋白含量,然后取匀浆上清液 100 μL,加入 100 μL 缓冲液和 20 μL 0.25 mg·mL⁻¹ Cd 溶液,充分混匀,室温(20 ℃)下放置 10 min;再加入 100 μL 9%牛血红蛋白,混匀后,100 ℃加热 2 min,冰上冷却;然后在 4 ℃、10 000 r·min⁻¹ 下离心 5 min。将加入血红蛋白、沸水浴和离心的过程重复 2 次,最后取上清液 1.0 mL,用石墨炉原子吸收法测 Cd 浓度。按 1 mol MT 结合 7 mol Cd 以及 Cd-MT 的分子量为 7 000 的换算原则^[17],将 Cd 含量换算成 MT 含量(μg·g⁻¹ 蛋白)。

1.6 统计分析

对实验数据先进行对数转换以符合正态分布,然后采用 SPSS17.0 对数据进行组间差异显著性的多重比较检验(LSD)和 2×2 析因设计方差分析(ANOVA),差异显著性水平为 0.05,析因分析中的交互作用即为联合作用中的协同或拮抗作用;若无交互作用,则联合作用为相加作用。实验结果以平均值±标准差表示。按照 Williamson 提出的响应指数 RI^[18]来衡量 Cd、Pb 及 Cd/Pb 对 SOD 和 MT 的作用类型与强度,当 T≥C 时,RI=1-C/T;当 T<C 时,RI=T/C-1,其中 C 为对照值,T 为处理值,当 RI>0 时表示具有促进作用,当 RI<0 时表示具有抑制作用,绝对值的大小与作用强度一致。

2 结果与分析

2.1 Cd、Pb 单一污染沉积物暴露对肝胰脏 SOD 活性的影响

Cd、Pb 单一污染沉积物暴露 28 d 后,铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 活性的变化如图 1 所示。结果显示,与对照组(37.11 U·mg⁻¹)相比,不同浓度的 Pb、Cd 处理组肝胰脏 SOD 活性均显著升高(P<0.05),RI>0,表现为促进作用。随 Cd 浓度的升高,SOD 活性的变化比

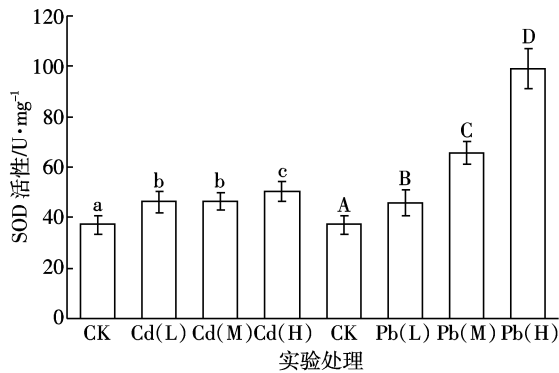


图 1 Cd、Pb 单一污染沉积物暴露下铜锈环棱螺肝胰脏的超氧化物歧化酶(SOD)活性

Figure 1 SOD activities of hepatopancreas in *Bellamya aeruginosa* exposed to individual Cd or Pb contaminated sediments (treatments without same letter differed significantly, $P < 0.05$, the same below)

较平缓,低浓度 Cd 处理组和中等浓度 Cd 处理组的 SOD 活性之间差异不显著(46.16 和 $46.34 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), RI 为 0.20 ;高浓度 Cd 处理组的 SOD 活性($50.29 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$)显著高于低、中浓度组, RI 为 0.26 。与 Cd 处理相比,随 Pb 浓度的升高,SOD 活性显著升高,且不同 Pb 处理组之间差异显著(45.95 、 65.52 和 $99.11 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), RI 分别为 0.19 、 0.43 和 0.63 。

2.2 Cd、Pb 单一污染沉积物暴露对肝胰脏 MT 含量的影响

不同浓度 Cd、Pb 单一污染沉积物暴露 28 d 后,铜锈环棱螺肝胰脏中 MT 含量的变化见图 2。结果显示,与对照组($8.67 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)相比,低浓度 Cd、Pb 处理组的 MT 含量均没有显著差异,说明低浓度 Cd、Pb 暴露对 MT 没有影响;中、高浓度 Cd 暴露引起 MT 水平显著升高(12.25 和 $21.22 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), RI 分别为 0.29 和 0.59 。中、高浓度 Pb 暴露导致 MT 水平显著下降 (7.23 和

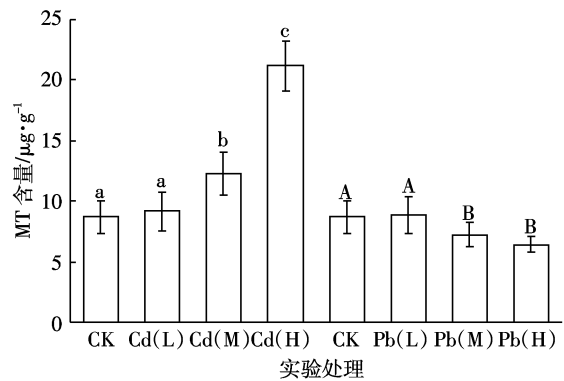


图 2 Cd、Pb 单一污染沉积物暴露下铜锈环棱螺肝胰脏的金属硫蛋白(MT)含量

Figure 2 MT contents of hepatopancreas in *Bellamya aeruginosa* exposed to individual Cd or Pb contaminated sediments

$6.41 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), RI 分别为 -0.17 和 -0.26 ,但二者之间差异不显著。

2.3 Cd/Pb 复合污染沉积物暴露对肝胰脏 SOD 活性和 MT 含量的影响

不同浓度的 Cd-Pb 复合污染沉积物暴露对铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 活性和 MT 含量的影响如图 3 所示。结果显示,与对照组相比,3 种 Cd-Pb 浓度组合均引起 SOD 活性显著升高(分别为 42.46 、 43.73 、 $48.82 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$),但升幅均较小,高浓度处理组与低、中等浓度处理差异显著, RI 分别为 0.13 、 0.15 和 0.24 ,均高于 Cd、Pb 单一暴露下的 RI 值。低浓度 Cd-Pb 联合暴露下铜锈环棱螺肝胰脏 MT 含量($5.25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)与对照组相比,差异不显著,说明对 MT 没有影响;中、高浓度 Cd-Pb 联合暴露引起 MT 含量显著升高(10.16 和 $14.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), RI 分别为 0.15 和 0.42 ,介于 Cd、Pb 单一暴露下的 RI 值之间。

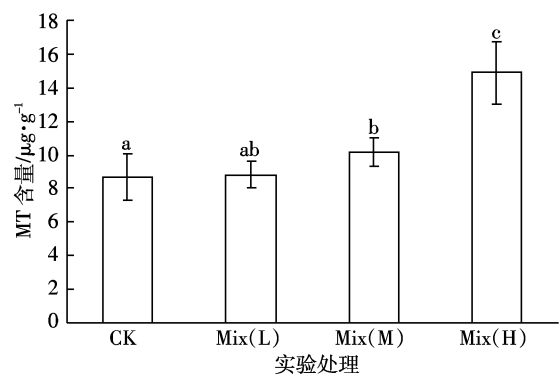
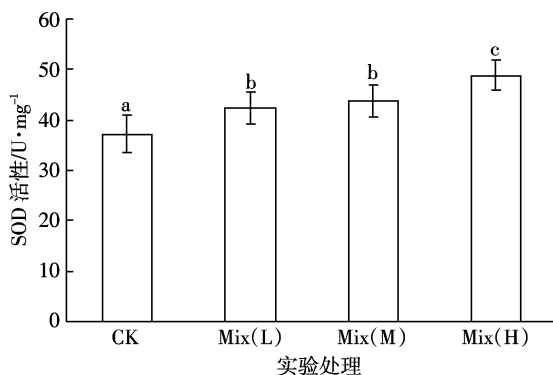


图 3 Cd/Pb 复合污染沉积物暴露下铜锈环棱螺肝胰脏的超氧化物歧化酶(SOD)活性和金属硫蛋白(MT)含量

Figure 3 SOD activities and MT contents of hepatopancreas in *Bellamya aeruginosa* exposed to combined Cd and Pb contaminated sediments

采用 2×2 析因设计方差分析可以较好地判断两种污染物联合作用时是否具有交互作用,而且可以通过直观的量-效应曲线图确定联合毒作用特征。如果不存在交互作用,则两条量效应曲线互相平行,联合作用表现为相加作用;如存在交互作用,且二曲线随剂量增大而远离,联合作用表现为协同作用;如果二曲线随剂量增大而靠近或交叉,联合作用表现为拮抗作用^[9]。Cd-Pb 对铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 和 MT 联合作用的析因分析结果和联合毒作用特征分别见表 2 和图 4。低、中和高浓度 Cd-Pb 联合暴露均对 SOD 具有交互作用($P < 0.05$),由 Cd、Pb 单独及交互作用的 Partial Eta² 可知,在低浓度暴露下,各因素对 SOD 变化的贡献均较小,大小顺序为 Mix(L) > Cd(L) > Pb(L),量-效应曲线提示低浓度 Cd-Pb 联合对 SOD 的交互作用表现为拮抗作用(图 4A)。在中等浓度暴露下,各因素对 SOD 变化的贡献是 Mix(M) > P(M) > Cd(M),

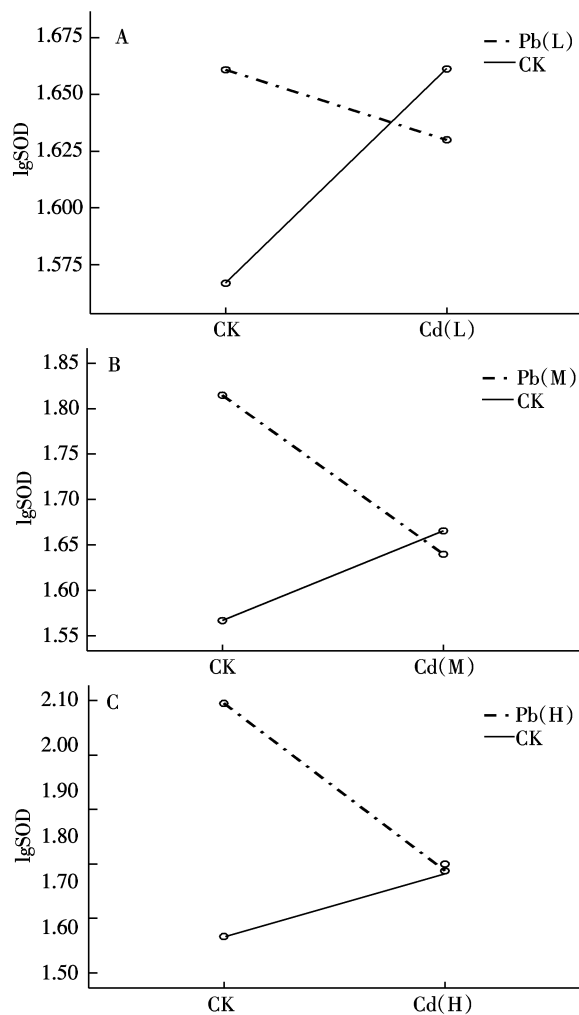


图 4 Cd/Pb 对铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 和 MT 的交互作用

Figure 4 Cd-Pb interaction effect on hepatopancreatic SOD and MT in *Bellamya aeruginosa*

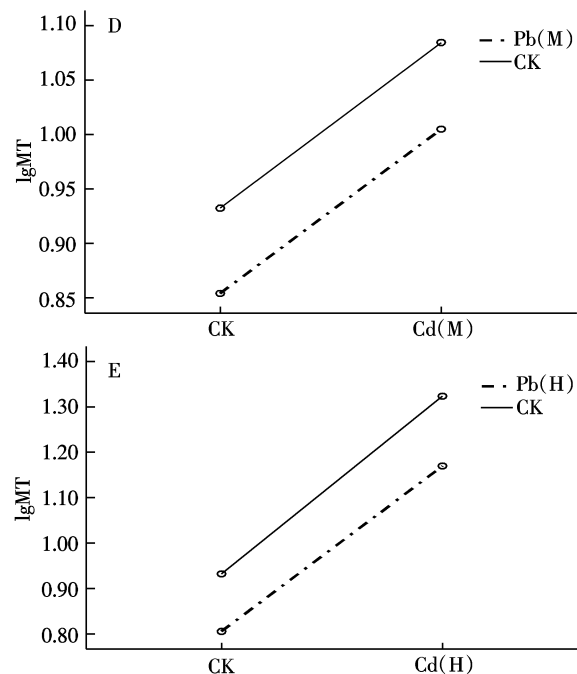
表 2 Cd/Pb 对铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 和 MT 联合作用的析因分析

Table 2 Factorial analyses of combined effects of Cd-Pb on hepatopancreatic SOD and MT in *Bellamya aeruginosa*

处理组	SOD			MT		
	F 值	P 值	Partial Eta ²	F 值	P 值	Partial Eta ²
Cd(L)	4.004	0.053	0.095	-	-	-
Pb(L)	3.919	0.055	0.093	-	-	-
Mix(L)	15.597	<0.001*	0.291	-	-	-
Cd(M)	7.039	0.012*	0.172	40.818	<0.001*	0.593
Pb(M)	60.102	<0.001*	0.639	11.102	0.001*	0.284
Mix(M)	91.106	<0.001*	0.728	0.001	0.983	0.000
Cd(H)	32.951	<0.001*	0.492	452.962	<0.001*	0.932
Pb(H)	187.300	<0.001*	0.846	62.564	<0.001*	0.655
Mix(H)	210.508	<0.001*	0.861	0.580	0.452	0.017

注: *表示差异显著($P < 0.05$); Partial Eta²: 表示各因素对变异的贡献。

量-效应曲线提示中等浓度 Cd-Pb 联合对 SOD 的交互作用表现为拮抗作用(图 4B)。在高浓度暴露下,各因素对 SOD 变化的贡献是 Mix(H) > Pb(H) > Cd(H),量-效应曲线提示高浓度 Cd-Pb 联合对 SOD 的交互作用表现为拮抗作用(图 4C)。由于低浓度 Cd、Pb 以及 Cd-Pb 联合暴露均对 MT 没有影响,且组间差异也不显著($P = 0.906$),因此不做析因分析。中、高浓度 Cd-Pb 联合暴露对 MT 没有交互作用,量-效应曲线提示联合作用为相加作用(图 4D 和 E)。



3 讨论

外源性化学物质胁迫导致生物机体氧化损伤的主要因素是细胞内过多活性氧自由基(ROS)的产生, SOD 是生物体内抗氧化防御系统中的关键酶类, 在消除多余自由基、平衡细胞内 ROS 总量、防止脂质过氧化和细胞膜损伤方面发挥重要作用^[20-21]。肝脏作为生物机体对外源物质的代谢解毒组织, 与毒物的接触程度最高, 是机体抗氧化防御的关键部位。当其受到外源物质胁迫后, 活性氧代谢失去平衡, 从而诱导 SOD 活性升高, 起到保护作用。但胁迫超过一定限度会破坏细胞抗氧化系统的平衡, 从而抑制 SOD 的作用。因此, 肝脏 SOD 活性的变化常常是衡量氧化胁迫的重要标志。MT 是生物体内的一种低分子量、富含半胱氨酸、具有热稳定性、可诱导型非酶蛋白, 在肝脏中的含量最为丰富。一般认为 MT 具有维持生物体内金属含量动态平衡和重金属解毒作用的双重作用^[22-23], 当受到重金属胁迫时, MT 水平的升高意味着其与重金属结合容量的增加, 从而增加对重金属解毒能力。因此, MT 通常被用作重金属污染胁迫的特异性生物标志物^[24]。有研究表明 MT 还有清除自由基、抵抗氧化胁迫的作用^[25-27]。本研究显示, 在单一 Cd、Pb 胁迫下, 铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 活性均表现为显著升高, 显示出明显的诱导效应。但比较发现, 随着胁迫浓度的增加, Cd 处理组 SOD 升幅明显小于 Pb 处理组; 就 MT 而言, Cd 处理组的 MT 含量随胁迫浓度升高而出现较大的提升, 而 Pb 处理组的 MT 含量显著下降。在单一 Cd 胁迫下, 相对较低的 SOD 活性可能与较高的 MT 水平直接相关, 因为 Cd 胁迫诱导 MT 生成, 使得进入细胞内的大部分 Cd 与 MT 结合形成 Cd-MT 复合物, 从而可能缓解了高浓度 Cd 氧化胁迫的压力。在单一 Pb 胁迫下, MT 含量的显著下降可能与相对较大的氧化胁迫压力有关, 因为 Pb 不能诱导 MT 生成^[28], 因此, 高浓度 Pb 胁迫下 MT 水平的下降提示 MT 因参与清除自由基而被消耗, 这就进一步证明 MT 在减轻重金属氧化胁迫中发挥了重要作用。

复合污染体系中污染物对生物的联合作用是一个十分复杂的问题, 与诸多因素有关, 如污染物的种类与浓度组合、测试生物的种类与所处生命阶段、胁迫方式与时间长短等。采用敏感的分子生物学指标评价污染物的联合作用不仅为揭示污染物联合毒性作用机理提供可能, 而且可以更加深刻地理解复合污染的潜在生态风险^[29-30]。本研究显示, 在实验浓度范围

内, 与对照组相比, Cd-Pb 联合暴露均对铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 具有显著的促进作用, 且 SOD 活性随浓度的增加而升高, 联合暴露下的 SOD 活性小于单一暴露, 析因分析显示为拮抗作用。这与有关研究的结果有所不同, 王学谦等发现 Cd-Pb 联合作用对原代培养的大鼠肾小管上皮细胞 SOD 活性具有显著的抑制效应^[4]; 李君等的研究表明, Cd、Pb 单一及联合作用均显著降低大鼠肾脏 SOD 的活性, 也显示为抑制效应, 而且 Cd-Pb 联合作用下的 SOD 活性显著低于单独作用, 表现出协同作用^[6]。这种差异说明 Cd-Pb 对 SOD 的联合作用与实验生物的种类、不同的组织器官、不同的染毒途径及作用时间有关。Cd 诱导产生的 MT 可能与拮抗作用有关, Cd 和 Pb 均可与 MT 结合, 从而降低游离 Cd 和 Pb 的生物利用度。还有研究指出, Cd-Pb 联合暴露的情况下, 由于 Cd 的存在能降低大鼠肝脏中 Pb 的浓度^[5]。在本研究中, 低浓度 Cd-Pb 联合对 MT 没有影响, 中、高等浓度 Cd-Pb 联合对 MT 的联合作用表现为相加作用, 因此, MT 对 Cd-Pb 联合胁迫的敏感性低于 SOD。Cd-Pb 联合对 MT 含量变化的相加作用主要与其对 MT 的生物学效应不同有关, Cd 对 MT 的诱导作用使其在 MT 的变化中起主导作用, 而 Pb 不能诱导 MT, 且由于其所致氧化胁迫而消耗一定量的 MT, Pb 只起到次要作用(表 2)。另外, 在实验浓度范围内, MT 上的金属结合位点可能还没有被饱和^[30], Cd 和 Pb 不存在竞争作用。由此可见, Cd-Pb 联合暴露对动物肝脏 SOD 和 MT 的影响要比单一暴露要复杂得多, Cd 与 Pb 之间的交互作用可能与诸多生理生化因子有关, 具体的机制还有待进一步研究。

目前有关基于急性毒性的环境污染物联合毒作用评价已经形成比较成熟的方法体系^[9]。为揭示污染物联合毒性作用的机理, 越来越多的研究开始从细胞分子水平来进行评价, 但基于亚慢性毒性的、以分子生物标志物为毒性指标的联合毒性作用评价方法尚未形成统一的体系, 目前的研究多采用量化比较来进行联合作用特征评价。如采用将联合毒性效应与单一毒性效应的加和进行比较来分析污染物联合暴露下的毒性机制, 但这种方法未考虑指标的本底值^[30]。另有人采用指标的净变化量来判定联合作用的类型^[31], 但这种方法仅能判断拮抗和协同作用, 而相加作用很难判断, 而且所得结果不一定具有统计学意义。酶活性受到污染物联合胁迫时, 诱导和抑制的情况均有发生, 为使两种情况具有可比性, 有人采用促进率和校

正促进率来判断联合作用类型^[32],但最大促进率不易确定。本实验采用析因设计方差分析法研究 Cd 与 Pb 之间的联合作用,它不仅可检验每个因素各水平间的差异,而且可检验各因素间的交互作用^[19,33],从而使研究结果更具有统计学意义。

4 结论

不同浓度 Cd、Pb 单一污染沉积物慢性胁迫后,铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 活性均随胁迫浓度的增加而显著升高,但中、高浓度 Pb 胁迫下的 SOD 活性明显高于 Cd 胁迫;低浓度 Cd、Pb 对 MT 没有影响,中、高浓度 Cd 胁迫显著增加 MT 的含量,但中、高浓度 Pb 胁迫显著减低 MT 含量,MT 含量的减少与抗氧化胁迫有关。低、中、高浓度 Cd/Pb 复合污染沉积物胁迫均可引起 SOD 活性显著升高,表现为拮抗作用,中、高浓度 Cd/Pb 胁迫引起 MT 含量显著升高,表现相加作用。铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 对 Cd/Pb 联合胁迫的敏感性高于 MT。

参考文献:

- [1] Farkas A, Erratico C, Vigan L. Assessment of the environmental significance of heavy metal pollution in surficial sediments of the River Po[J]. *Chemosphere*, 2007, 68(4):761-768.
- [2] Greenstein D, Bay S, Anderson B, et al. Comparison of methods for evaluating acute and chronic toxicity in marine sediments[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(4):933-944.
- [3] Skoczyska A, Wróbel J, Andrzejak R. Lead-cadmium interaction effect on the responsiveness of rat mesenteric vessels to norepinephrine and angiotensin II[J]. *Toxicology*, 2001, 162(3):157-170.
- [4] 王学谦,尹先仁,白雪涛. 铅镉联合作用对大鼠肾小管上皮细胞脂质过氧化的影响[J]. 卫生研究, 2002, 31(4):232-234.
WANG Xue-qian, YIN Xian-ren, BAI Xue-tao. Combined effect of lead and cadmium on lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells of rats[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2002, 31(4):232-234.
- [5] Pillai A, Gupta S. Effect of gestational and lactational exposure to lead and/or cadmium on reproductive performance and hepatic oestradiol metabolising enzymes[J]. *Toxicology Letter*, 2005, 155(1):179-186.
- [6] 李君,潘家荣,魏益民. 铅镉联合作用对大鼠肾脏脂质过氧化影响[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(8):957-958.
LI Jun, PAN Jia-rong, WEI Yi-min. Combined effects of lead and cadmium on peroxidation of endocrine in kidneys of rats[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2007, 23(8):957-958.
- [7] 卞建春,路浩,梅莉,等. 铅镉联合染毒对大鼠大脑皮质神经细胞的氧化损伤及 NAC 的保护效应[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(9):805-809.
BIAN Jian-chun, LU Hao, MEI Li, et al. Lipid peroxidation and protective effect of NAC on lead and/or cadmium in cerebral cortical neurons of rats[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38(9):805-809.
- [8] 王丙莲,张迎梅,谭玉凤,等. 镉铅对泥鳅 DNA 甲基化水平的影响[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(2):78-80.
WANG Bing-lian, ZHANG Ying-mei, TAN Yu-feng, et al. Influence of cadmium and lead on the DNA methylation level of loach *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Journal of Toxicology*, 2006, 20(2):78-80.
- [9] 王丙莲,张迎梅,侯亚妮,等. 镉铅对泥鳅组织转氨酶活性的影响[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2006, 42(3):67-70.
WANG Bing-lian, ZHANG Ying-mei, HOU Ya-ni, et al. Effects of cadmium and lead on transaminase activities in tissues of *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Journal of Lanzhou University (Natural Sciences)*, 2006, 42(3):67-70.
- [10] 陈其羽,宋宝贵. 铜锈环棱螺繁殖和生长的初步研究[J]. 水生生物学集刊, 1975, 5(4):519-534.
CHEN Qi-yu, SONG Bao-gui. A preliminary study on reproduction and growth of the snail, *Bellamya aeruginosa*(Veeve)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, 5(4):519-534.
- [11] MacDonald D D, Ingersoll C G, Berger T A. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, 39(1):20-31.
- [12] Pasteris A, Vecchi M, Reynoldson T B, et al. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex*(Oligochaeta, Tubificidae): a comparison of the 28-day reproductive bioassay with a 6-month cohort experiment[J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65(3):253-265.
- [13] Simpson S L, Angel B M, Jolley D F. Metal equilibration in laboratory-contaminated (spiked) sediments used for the development of whole-sediment toxicity tests[J]. *Chemosphere*, 2004, 54(5):597-609.
- [14] Redmond M S, Scott J K, Swartz R C, et al. Preliminary culture and life-cycle experiments with the benthic amphipod *Ampelisca abdita*[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1994, 13(8):1355-1365.
- [15] Ringenary M J, Molof A H, Tanacredi J T, et al. Long-term sediment bioassay of lead toxicity in two generations of the marine amphipod *E-lasmopus laevis*, S. I. Smith(1873)[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26(8):1700-1710.
- [16] 加春生,李金龙,徐世文. 镉致鸡血管氧化应激与金属硫蛋白含量的变化[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(2):178-183.
JIA Chun-sheng, LI Jin-long, XU Shi-wen. Effects of cadmium on oxidative stress and metallothionein of blood vessel in hens[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(2):178-183.
- [17] Hamilton S J, Mehrle P M, Jones J R. Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1987, 116(4):551-560.
- [18] Williamson G B, Richardson D. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent controls[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1988, 14(1):181-187.
- [19] 张蕾,徐镜波,杨丽. 析因试验设计在环境污染联合毒性研究中的应用[J]. 干旱环境监测, 2004, 18(1):20-22.
ZHANG Lei, XU Jing-bo, YANG Li. Application of analysing reason examination design in studying associated toxicity of environment con-

- tamination[J]. *Arid Environmental Monitoring*, 2004, 18(1):20-22.
- [20] 王 燕, 陈永刚, 葛郑增. TBT 对大鼠肝脏 ROS、抗氧化酶和解毒酶系统的影响[J]. 中国环境科学, 2005, 25(4):428-431.
- WANG Yan, CHEN Yong-gang, GE Zheng-zeng. Influence of TBT on ROS, antioxidant enzymes and detoxification system enzyme in rat liver [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(4):428-431.
- [21] 吴 伟, 聂凤琴, 瞿建宏, 等. 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚对鲫鱼离体肝脏组织的氧化胁迫[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(5):1005-1009.
- WU Wei, NIE Feng-qin, QU Jian-hong, et al. Oxidative stress of tetra-bromodiphenyl ether to the liver of *Carassius auratus*. in Vitro[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(5):1005-1009.
- [22] 周彦锋, 陈家长, 杨 光, 等. 重金属镉胁迫下鲫鱼不同组织中金属硫蛋白的动态变化[J]. 安全与环境学报, 2008, 8(3):18-21.
- ZHOU Yan-feng, CHEN Jia-zhang, YANG Guang, et al. On the dynamic variations of metallothionein in the different tissues of *Carassius auratus* due to the exposure of different concentrations of cadmium[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2008, 8(3):18-21.
- [23] 陈 春, 周启星. 金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(3):425-432.
- CHEN Chun, ZHOU Qi-xing. Researching advance in metallothionein and its biomarker of heavy metal contamination[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(3):425-432.
- [24] Roesijadi G. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1994, 102(12, Supplement):91-95.
- [25] Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, et al. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, 131(4):447-455.
- [26] Tate D J, Miceli M V, Newsome D A. Expression of metallothionein isoforms in human chorioretinal complex[J]. *Current Eye Research*, 2002, 24(1):12-25.
- [27] Mosleh Y Y, Paris-Palacios S, Ahmed M T, et al. Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae)[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(1):167-175.
- [28] Homa J, Olchawa E, Stürzenbaum S R, et al. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 135(2):275-280.
- [29] Kohler H-R, Eckwert H. The induction of stress proteins(hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure, II: Joint toxicity and transfer to field situations[J]. *Ecotoxicology*, 1997, 6(5):263-274.
- [30] 张 融, 范文宏, 唐 戈, 等. 水体中重金属镉和锌对大型蚤联合毒性效应的初步研究[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(3):286-290.
- ZHANG Rong, FAN Wen-hong, TANG Ge, et al. A preliminary study on joint toxic effects of Cd and Zn on *Daphnia magna*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(3):286-290.
- [31] 杨春璐, 孙铁珩, 和文祥. 汞和两种农药复合污染对土壤转化酶活性的影响[J]. 中国环境科学, 2006, 26(4):486-490.
- YANG Chun-lu, SUN Tie-heng, HE Wen-xiang. Influence of joint pollution of mercury and two kinds of pesticides on invertase activity in soils[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(4):486-490.
- [32] 华 涛, 周启星. Cd-Zn 对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的联合毒性及对肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. 环境科学学报, 2009, 29(3):600-606.
- HUA Tao, ZHOU Qi-xing. Joint toxic effects of Cd and Zn on grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and SOD activity in livers [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(3):600-606.
- [33] 赵俊杰, 张高川, 葛 滢, 等. 土壤镉单一及复合污染对蚯蚓金属硫蛋白含量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(6):1269-1272.
- ZHAO Jun-jie, ZHANG Gao-chuan, GE Ying, et al. Effect of Zn and Cd single and combined pollution on metallothionein content of earthworm in soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(6):1269-1272.